

①⑨ RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①⑪ N° de publication : **2 769 315**
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)
②① N° d'enregistrement national : **97 12379**

⑤① Int Cl⁶ : C 07 H 19/00, C 07 H 21/00, 23/00, C 12 Q 1/68 //
(C 07 H 23/00, 19:00) (C 07 H 23/00, 21:00)

①② **DEMANDE DE BREVET D'INVENTION**

A1

②② Date de dépôt : 03.10.97.

③③ Priorité :

④③ Date de mise à la disposition du public de la
demande : 09.04.99 Bulletin 99/14.

⑤⑥ Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du
présent fascicule*

⑥① Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

⑦① Demandeur(s) : CIS BIO INTERNATIONAL SOCIÉTÉ
ANONYME — FR.

⑦② Inventeur(s) : BAZIN HERVE et MATHIS GERARD.

⑦③ Titulaire(s) :

⑦④ Mandataire(s) : CABINET BEAU DE LOMENIE.

⑤④ **CONJUGUES FLUORESCENTS DE NUCLEOSIDES OU DE NUCLEOTIDES, LEUR PROCEDE DE
PREPARATION ET LEUR UTILISATION.**

⑤⑦ L'invention concerne de nouveaux conjugués fluores-
cents de nucléosides ou de nucléotides, utilisables notam-
ment pour détecter, localiser et/ ou isoler des acides
nucléiques ou des molécules d'intérêt biologique ou clinique
à structure nucléosidique ou susceptibles d'interagir avec
des acides nucléiques.

FR 2 769 315 - A1



L'invention concerne de nouveaux conjugués fluorescents de nucléosides ou de nucléotides, utilisables notamment pour détecter, localiser et/ou isoler des acides nucléiques ou des molécules d'intérêt biologique ou clinique à structure nucléosidique ou susceptibles d'interagir avec des acides nucléiques.

5 Dans la suite de la description, les abréviations suivantes seront utilisées :

ARN : acide ribonucléique

ADN : acide désoxyribonucléique

A : Adénosine

C : Cytidine

10 G : Guanosine

T : Thymidine

U : Uridine

I : Inosine

suffixe MP : monophosphate

15 suffixe DP : diphosphate

suffixe TP : triphosphate

préfixe d : désoxy.

Une réaction de synthèse enzymatique d'ADN emploie une matrice d'ARN ou d'ADN, une amorce oligonucléotidique de séquence complémentaire à un
20 segment de la matrice, une enzyme appropriée et quatre désoxynucléotides dATP, dCTP, dGTP et dTTP (ou dUTP). Diverses enzymes sont connues, comme E. Coli DNA polymérase, T7 DNA polymérase, le fragment de Klenow de la DNA polymérase, la Taq DNA polymérase, une transcriptase inverse, auxquelles on peut ajouter la terminal nucléotidyl transférase qui présente la particularité de ne
25 pas nécessiter de matrice. La synthèse d'ARN se fait de façon similaire sinon que les amorces et matrices requises sont différentes et que des ribonucléotides (ATP, CTP, GTP et UTP) sont utilisés en présence de RNA polymérases.

Les nucléotides ou polynucléotides peuvent être marqués radioactivement (^3H , ^{32}P , ^{14}C , ^{35}S ou ^{125}I).

30 L'utilisation de molécules marquées présente les inconvénients classiquement associés avec les isotopes radioactifs qui sont les risques liés à la radioactivité ainsi qu'un stockage et une disponibilité limités due à la décroissance radioactive et aux phénomènes de radiolyse.

Le marquage chimique au niveau des nucléotides ou des polynucléotides, permettant d'éviter ces inconvénients, a été décrit dans la littérature. Notamment,
35 on a décrit le marquage par de la biotine de nucléotides dérivés du dUTP ou de l'UTP

(Langer P.R., Waldrop A.A., Ward D.C., 1981 ; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 6633-37). Ce sont des dérivés dans lesquels la biotine est liée à la position C-5 du noyau pyrimidine par un bras alkylamine. Ces nucléotides marqués sont incorporés in vitro dans des polynucléotides par l'action de polymérases à ADN ou à ARN (EP 0 063 879) et permettent une détection colorimétrique d'acides nucléiques par une réaction de « dot-blot » (Leary J.J., Brigati D.J. and Ward D.D. ; 1983 ; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80, 4045-49).

D'autres analogues de nucléotides marqués à la biotine basés sur des dérivés de la N-4-aminoalkyl-désoxy-cytidine et de la N-6-aminoalkyl-désoxyadénosine sont décrits dans le brevet US 4,828,979 et dans Gebegehu G.G. *et al.* Nucleic. Acids. Res ; 1987, 15, 4513-4534.

Des dérivés de dUTP, de dATP substitué par de la biotine en position C-8, ainsi que la possibilité de substitution en C-7 d'une 7-déazapurine sont également décrits (EP 0 063 879).

Le dérivé Bio-15-dGTP a également été décrit (Gilliam I.C. and Tener G.M. ; 1989 ; Nucleoside & Nucleotide ; 8, 1453-62). Des dérivés fluorescents tels que la fluorescéine ou la rhodamine peuvent être incorporés dans un acide nucléique par l'intermédiaire d'un nucléoside triphosphate (dATP, dUTP, dCTP) marqué (WO 93 19206). Une discussion sur la position des substitutions sur les purines et pyrimidines ainsi que sur la nature des bras espaceurs utilisables pour le marquage des didésoxynucléotides avec des dérivés de la fluorescéine, bien que dédiée aux terminateurs de chaîne pour le séquençage, donne une vue d'ensemble de la chimie des nucléotides marqués (Confalone P.T., 1990, J. Heterocyclic Chem., 27, 31-46).

L'utilisation conjointe de nucléosides triphosphate marqués à l'aide de traceurs différents (Biotine-11-dUTP, dig-11-dUTP et FITC-11dUTP) permet une visualisation simultanée de séquences différentes lors d'une hybridation (RIED T. *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1992), 89, 1388-1392).

L'incorporation de désoxynucléotides marqués à la fluorescéine tels que FI-dUTP ou FI-dCTP est également effectuée en ne substituant que partiellement le nucléotide naturel par le composé marqué, dCTP / FI-dCTP \approx 2:1 (WO93/19206). Ce même brevet décrit que par un choix de l'enzyme et des conditions expérimentales, il est possible de substituer la totalité d'un nucléotide par un nucléotide marqué.

Les données de la littérature montrent que l'efficacité d'incorporation d'un conjugué de triphosphate est modifiée par le couplage d'une molécule comme la biotine et dans une moindre mesure par la présence du bras permettant le couplage.

Par exemple, dans une réaction de « nick-translation » en présence d'une polymérase à ADN, les taux d'incorporation de divers analogues de triphosphates ont été comparés au nucléoside naturel pris comme référence (100 % d'incorporation) pour un même temps de réaction (90 min) (Gebeyehu G. *et al.* Nucleic Acids Res., 1987, 15, 4525).

Les molécules conjuguées à des triphosphates de nucléosides (Goodchild, J. Bioconjugate chem., 1990, p171 ; Kricka J. Non isotopic Blotting, and Sequencing 1995 Academic Press p47 ; Zhu Z. *et al.* Nucleic Acids Res., 1994, 3418-3422) sont des molécules de taille relativement petites (<800Da), soit neutres soit chargées négativement et de forme essentiellement plane et par conséquent, leur encombrement est réduit mais suffisant pour perturber l'incorporation enzymatique du nucléoside triphosphate.

On a maintenant trouvé de nouveaux conjugués de nucléosides ou de nucléotides comprenant :

- un ribo- ou désoxyribo-nucléoside ou nucléotide natif ou chimiquement modifié ou conjugué à une ou plusieurs molécules marqueur(s), dont au moins un atome de carbone du cycle ou d'azote exocyclique du cycle purique ou pyrimidique est susceptible d'être impliqué dans une liaison avec un marqueur fluorescent, et
- au moins un marqueur fluorescent lié au(x)dit(s) atome(s) constitué par un cryptate de terre rare.

Lesdits conjugués peuvent être utilisés dans toutes les applications des nucléosides ou nucléotides marqués sans présenter d'inconvénients majeurs d'utilisation et présentent notamment une capacité élevée à être incorporés dans de l'ADN simple brin ou double brin.

Ces propriétés sont d'autant plus surprenantes que les cryptates de terre rare sont des molécules de masse moléculaire élevée (supérieure à 1400 Da), possédant une structure tridimensionnelle qui présente plus d'encombrement stérique qu'une molécule globalement plane, et ayant un caractère ionique provenant de la présence de l'ion complexé qui leur confère une charge positive.

Du fait de ces caractéristiques structurales, on pouvait s'attendre à ce que les charges positives d'un cryptate de terre rare interagissent fortement avec les charges négatives du groupe triphosphate et modifient sa réactivité ainsi que les qualités de fluorescence du cryptate.

Egalement, l'activité des enzymes telles que les polymérases étant sensibles à la présence et à la concentration de certains ions ou agents complexants dans le milieu réactionnel, on pouvait s'attendre à ce que les

conjugués selon l'invention entraînent une forte diminution de l'incorporation des nucléotides triphosphates, et donc un faible rendement, notamment lors d'une synthèse de polynucléotides.

De manière surprenante, les résultats obtenus en utilisant les conjugués selon l'invention montrent que, non seulement les cryptates de terre rare n'ont pas d'influence défavorable dans les applications qui font intervenir des réactions enzymatiques, mais conservent leurs propriétés fluorescentes intrinsèques.

De manière avantageuse, on a également trouvé que les conjugués selon l'invention présentaient de nouvelles caractéristiques de fluorescence et, en particulier, que la durée de vie d'émission de l'ion de terre rare complexé était significativement augmentée.

Lesdits conjugués peuvent donc être utilisés à titre de marqueurs fluorescents dans toutes les utilisations dans lesquelles on effectue une détection quantitative ou qualitative par mesure de la fluorescence directe ou indirecte.

Dans un aspect préféré, l'invention concerne des conjugués fluorescents de nucléotides dans lesquels le ribo- ou désoxyribo-nucléotide est choisi parmi AMP, ADP, ATP, GMP, GDP, GTP, CMP, CDP, CTP, UMP, UDP, UTP, TMP, TDP, TTP, 2Me AMP, 2Me ADP, 2Me ATP, 1Me GMP, 1Me GDP, 1Me GTP, 5Me CMP, 5Me CDP, 5Me CTP, 5MeO CMP, 5MeO CDP, 5MeO CTP, 7-déaza-ATP, 7-déaza-GTP et les désoxy- ou didésoxy- ribonucléotides correspondants et en particulier

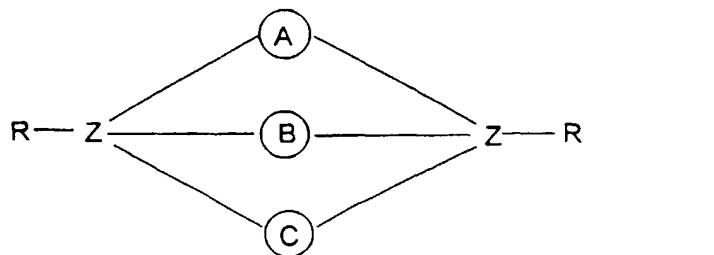
- les dérivés de la 2'-désoxy-uridine-5'-triphosphate ou de l'uridine-5'-triphosphate fonctionnalisés en position 5 de la base (principalement squelette aminoallyle ou aminopropyne),
- les dérivés de la 2'-désoxy-cytidine-5'-triphosphate ou de la cytidine-5'-triphosphate fonctionnalisés en position 4 ou 5 de la base (principalement squelette aminoallyle ou aminopropyne pour la position 5),
- les dérivés de la 2'-désoxy-adénosine-5'-triphosphate ou de l'adénosine-5'-triphosphate fonctionnalisés en position 6 ou 8 de la base,
- les dérivés de la 2'-désoxy-guanosine-5'-triphosphate ou de la guanosine-5'-triphosphate fonctionnalisés en position 6 ou 8 de la base,
- les dérivés de la 2'-désoxy-7-déaza-adénosine-5'-triphosphate ou de la 7-déaza-adénosine-5'-triphosphate fonctionnalisés en position 7 de la base, et
- les dérivés de la 2'-désoxy-7-déaza-guanosine-5'-triphosphate ou de la 7-déaza-guanosine-5'-triphosphate fonctionnalisés en position 7 de la base.

Selon un autre aspect, l'invention concerne des conjugués fluorescents de nucléosides dans lesquels le ribo- ou désoxyribo-nucléoside est choisi parmi A, G, C, U, T, les désoxy- ou didésoxynucléosides correspondants, et leurs analogues chimiquement modifiés, et en particulier la 3'-azido-3'-désoxythymidine et ses dérivés ; et les analogues 2', 3'-didéoxy de A, T, C, G, U, I.

Le marqueur fluorescent est constitué par un cryptate de terre rare choisi de préférence parmi les cryptates de terbium, d'euporium, de samarium ou de dysprosium.

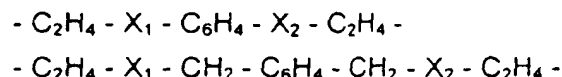
Dans la suite de la description, la notion de « cryptate » ainsi que la nomenclature des macrocycles et polycycles utilisables sont telles que définies par J.M. Lehn dans Struct. Bonding (Berlin), 16, 1, 1973 et dans Acc. Chem. Res. 11, 49 (1978).

Selon un aspect préféré, ledit cryptate de terre rare est constitué d'au moins un sel de terre rare complexé par un composé macropolycyclique de formule

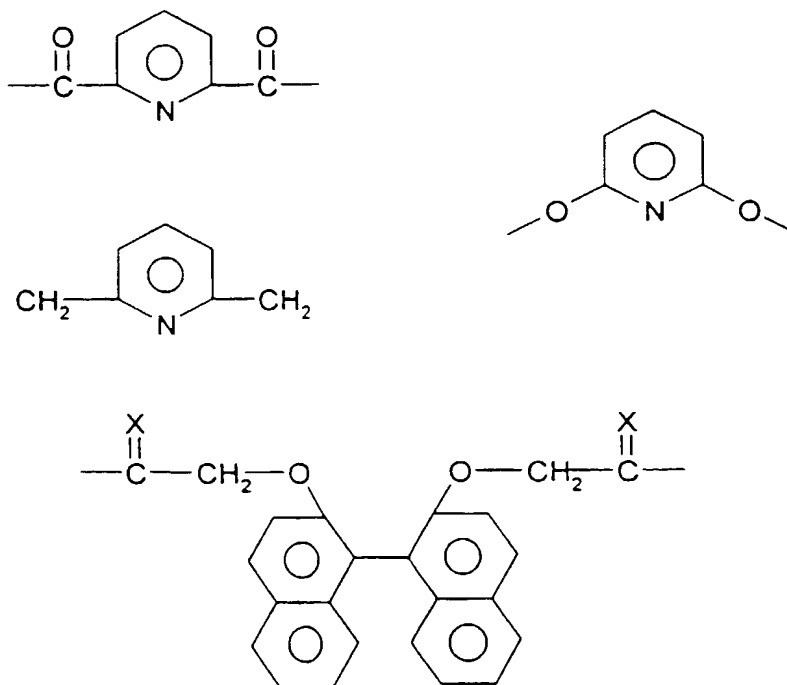


dans laquelle Z est un atome ayant 3 ou 4 valences, R est rien ou représente l'hydrogène, le groupe hydroxy, un groupe amino ou un radical hydrocarboné, les radicaux bivalents (A), (B) et (C), sont indépendamment l'un de l'autre des chaînes hydrocarbonées qui contiennent éventuellement un ou plusieurs hétéroatomes et sont éventuellement interrompues par un hétéromacrocycle, au moins l'un des radicaux (A), (B) et (C) comportant de plus au moins un motif moléculaire ou étant essentiellement constitué par un motif moléculaire, ledit motif moléculaire possédant une énergie de triplet supérieure à celle du niveau émissif de l'ion de terre rare complexé.

De préférence, il s'agit d'un cryptate de formule (I) ci-dessus dans laquelle le motif moléculaire est choisi parmi la phénanthroline, l'anthracène, le benzène, le naphthalène, les bi- et ter-phényle, l'azobenzène, l'azopyridine, la pyridine, les bipyridines, les bisquinoléines et les composés de formules ci-après :



X_1 et X_2 pouvant être identiques ou différents désignent l'oxygène, l'azote ou le soufre,



5 X étant l'oxygène ou l'hydrogène.

Dans un aspect avantageux, le marqueur fluorescent est un cryptate de terre rare constitué de l'ion terbium ou europium complexé par l'un des composés macrocycliques ci-après :

10 (22)phénanthroline ; (22)phénanthroline amide ; (22)anthracène ;
 (22)anthracène amide ; (22)bi-isoquinoléine ; (22)biphényl-bis-pyridine ;
 (22)bipyridine ; (22)bi-pyridine amide ; les macropolycycles tris-bipyridine, tris-
 phénanthroline, phénanthroline-bis-bipyridine, bi-isoquinoléine-bis-bipyridine, bis-
 bipyridine diphenylbipyridine.

15 Un marqueur particulièrement avantageux est le cryptate d'euporium Eu
 tris bipyridine.

De tels composés sont par exemple décrits dans le brevet EP 180 492.

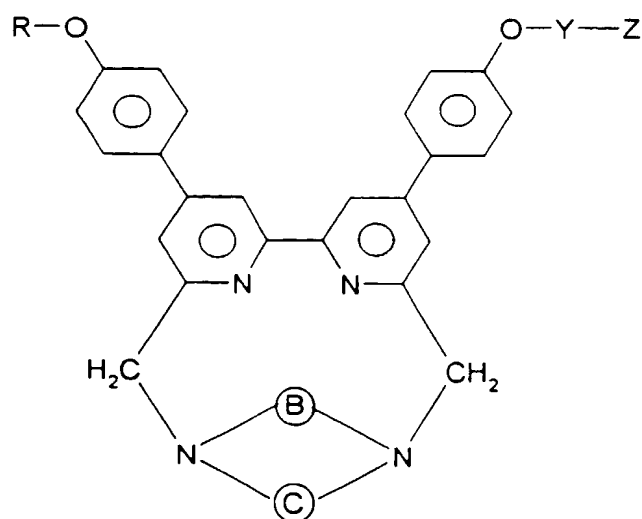
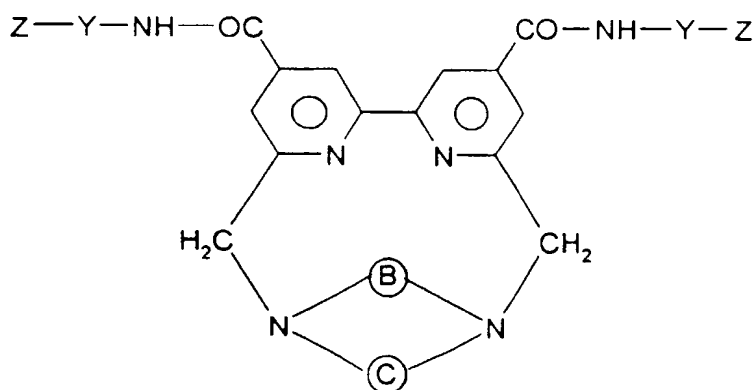
20 On peut également utiliser des composés macropolycycliques cryptates
 complexant des ions de terre rare dans lesquels le motif moléculaire est choisi
 parmi les bipyrazines, les bipyrimidines et les hétérocycles azotés comportant des
 groupes N-oxydes.

Des composés macropolycycliques à unités bipyrazines sont décrits dans F. Bodar-Houillon et al., New J. Chem., 1996, 20, 1041-1045.

Des composés macropolycycliques à unités bipyrimidines sont décrits dans J. M. Lehn et al., Helv. Chim. Acta, 1992, 75, 1221.

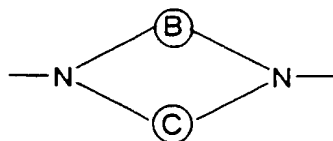
- 5 Des composés macropolycycliques comprenant des hétérocycles azotés comportant des groupes N-oxydes sont décrits dans J.M. Lehn et al., Helv. Chim. Acta, 1991, 74, 572.

Le cryptate de terre rare utilisé comme marqueur fluorescent peut également être constitué d'au moins un sel de terre rare complexé par un composé
10 macropolycyclique répondant à l'une des formules II ou III ci-après :

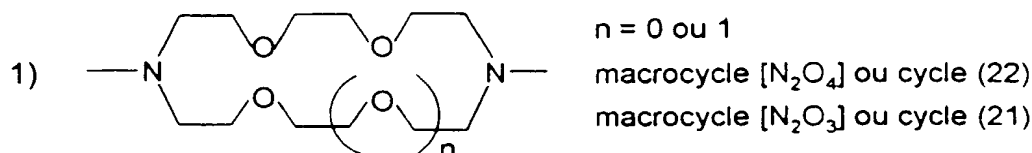


dans lesquels :

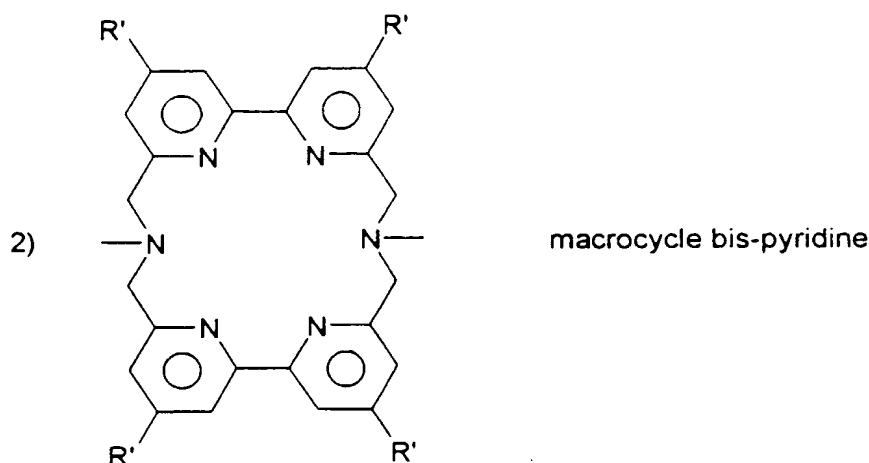
- le cycle de formule



est l'un des cycles suivants :



5



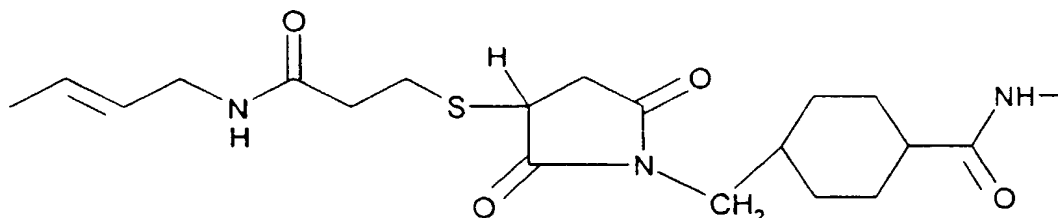
- Y est un groupe ou un bras d'espacement qui est constitué par un radical organique bivalent, choisi parmi les groupes alkylène linéaires ou ramifiés en C_1 à C_{20} contenant éventuellement une ou plusieurs doubles liaisons et/ou étant éventuellement interrompus par un ou plusieurs hétéroatomes tels que l'oxygène, l'azote, le soufre ou le phosphore, parmi les groupes cycloalkylène en C_5 à C_8 ou parmi les groupes arylène en C_6 à C_{14} , lesdits groupes alkylène, cycloalkylène ou arylène étant éventuellement substitués par des groupes alkyle, aryle ou sulfonate ;
- Z est un groupe fonctionnel susceptible de se lier de façon covalente avec une substance biologique ;
- R est un groupe méthyle ou représente le groupe -Y-Z ;
- R' est l'hydrogène ou un groupe -COOR'' dans lequel R'' est un groupe alkyle en C_1 à C_{10} et représente de préférence le groupe méthyle, éthyle ou tertibutyle ou bien R' est un groupe -CO-NH-Y-Z.

De tels composés sont décrits par exemple dans le brevet EP 321 353.

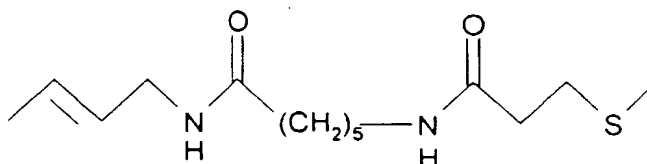
Au sein des conjugués selon l'invention, ledit marqueur fluorescent peut être lié au ribo- ou désoxyribo-nucléoside ou nucléotide soit directement, soit par l'intermédiaire d'un bras d'espacement.

Ce bras d'espacement est par exemple constitué par un radical organique bivalent, choisi parmi les groupes alkylène linéaires ou ramifiés en C₁-C₂₀, contenant éventuellement une ou plusieurs doubles liaisons ou triples liaisons et/ou éventuellement interrompus par un ou plusieurs hétéroatomes, tels que l'oxygène, l'azote, le soufre ou le phosphore ; les groupes carbamoyle et carboxamido ; les groupes cycloalkylène en C₅-C₈ et les groupes arylène en C₆-C₁₄, lesdits groupes alkylène, cycloalkylène ou arylène étant éventuellement substitués par des groupes alkyle, aryle ou sulfonate.

En particulier, il peut être choisi parmi les groupes :



15 et



Dans un aspect préféré, le conjugué selon l'invention comprend un désoxyribonucléotide qui est la désoxyuridine, un marqueur fluorescent qui est le cryptate d'euporium Eu trisbipyridine et un bras d'espacement qui est un groupe 3-aminoallyle.

L'invention concerne également, selon un aspect ultérieur, un procédé de préparation des conjugués décrits plus hauts.

Ledit procédé de préparation est caractérisé en ce qu'on fait réagir un ribo- ou désoxyribo-nucléoside ou nucléotide natif ou chimiquement modifié ou conjugué à une ou plusieurs molécules marqueur(s), dont au moins un atome de carbone du cycle ou d'azote exocyclique du cycle purique ou pyrimidique est susceptible d'être impliqué dans une liaison avec un marqueur

fluorescent avec au moins un marqueur fluorescent lié au(x)dit(s) atome(s) constitué par un cryptate de terre rare, et qu'on isole le conjugué ainsi obtenu.

Les ribo- ou désoxyribo-nucléosides ou nucléotides ainsi que les marqueurs fluorescents utilisables dans ce procédé de préparation sont tels que
5 décrits plus haut.

Les conjugués selon l'invention qui comprennent un ribo- ou un désoxyribonucléotide sont particulièrement adaptés pour toutes les applications qui nécessitent une mesure qualitative ou quantitative lors de la synthèse ou de l'utilisation de polynucléotides.

10 On notera que si l'on utilise des cryptates bi-fonctionnalisés, la conjugaison ne se fait que sur un bras, ce qui permet toujours l'incorporation du conjugué dans le cadre d'une synthèse de polynucléotides.

Les conjugués selon l'invention qui comprennent un ribo- ou un désoxyribonucléotide peuvent être utilisés pour la détection et/ou la localisation de
15 composés contenant au moins une séquence d'acide nucléique.

Parmi ces utilisations, on peut citer de manière non limitative :

- la détection et/ou la localisation de séquences spécifiques d'ADN, par exemple en vue de l'établissement de la cartographie de chromosomes ou la détection d'une mutation ;
- 20 - la synthèse de sondes utilisables en recherche biomédicale ou pour l'établissement d'un diagnostic clinique.

On peut également les utiliser dans un procédé de mesure de l'activité enzymatique d'une enzyme impliquée dans une réaction de synthèse d'acide nucléique, par exemple une activité polymérase, transcriptase inverse, transférase
25 ou ligase, dans laquelle on mesure la fluorescence émise directement ou indirectement par ledit conjugué, ladite émission de fluorescence étant corrélée au taux d'incorporation dudit conjugué dans le polynucléotide d'acide nucléique synthétisé.

Les conjugués selon l'invention peuvent également être utilisés pour
30 mesurer l'activité enzymatique d'une enzyme ayant pour substrat un acide nucléique, par exemple une activité phosphodiesterase, DNase ou Rnase, la fluorescence émise directement ou indirectement par ledit conjugué étant corrélée soit à ladite activité, soit à l'inhibition de ladite activité.

On peut également les utiliser pour mesurer une activité enzymatique
35 modifiant la structure d'un acide nucléique telle qu'une activité hélicase ou intégrase

ou une activité modifiant la topologie d'un acide nucléique telle qu'une activité topoisomérase.

Les conjugués selon l'invention peuvent également être utilisés à titre de marqueurs, par exemple pour la préparation d'un composé comprenant un acide
5 nucléique dans lequel est incorporé ledit conjugué en vue d'une détection.

La fluorescence émise par les conjugués selon l'invention peut être soit « directe » : le signal lumineux est émis par le conjugué après excitation à une longueur d'onde donnée, soit « indirecte » : l'émission du signal lumineux est induite par un transfert d'énergie non radiatif entre le conjugué après excitation dit
10 « composé donneur » et une autre molécule fluorescente dite « composé accepteur ».

Dans ce cas particulier, les conditions suivantes sont remplies :

- d'une part, le composé fluorescent accepteur possède un spectre d'absorption qui recouvre au moins partiellement le spectre d'émission du donneur
15 et présente une absorbance molaire élevée dans cette zone de recouvrement, et un spectre d'émission dans une gamme de longueur d'ondes où le donneur présente une émission intrinsèque faible ;

- d'autre part, l'accepteur et le donneur se situent à proximité l'un de l'autre, l'orientation de leurs dipôles de transition étant approximativement parallèles.

20 Le principe de la technique de transfert d'énergie non radiatif est décrit notamment dans G. Mathis et al., Clin. Chem., 1993, 39, 1953-1959.

L'invention est illustrée par les exemples ci-après, dans lesquels certaines concentrations sont données en unité d'absorption (UA) à une longueur d'onde donnée (exprimée en nm) par unité de volume (exprimée en ml) et exprimées par
25 le même chiffre que la densité optique de la solution concernée.

EXEMPLE 1 : Synthèse du conjugué dUTP-cryptate d'euporium trisbipyridine (K-dUTP).

Le nucléoside-triphosphate utilisé est le 5-[N-(6-aminocaproyl)-3-aminoallyl]-2'-désoxyuridine-5'-triphosphate] (AH-dUTP) préparé par réaction du
30 trifluoroacétamido-caproate de N-hydroxysuccinimide (M.S Urdea et al., Nucleic acids Res., 1988, 16, 4937) sur le 5-(3-aminoallyl)-2'-désoxyuridine-5'-triphosphate préparé suivant un procédé de la littérature (Langer et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1981), 78, 6633-6637), suivi d'une déprotection ammoniacale. Le composé
35 est purifié sur DEAE-Sepharose[®] (Pharmacia) dans un gradient linéaire d'hydrogénocarbonate de triéthylammonium (0,1 M à 0,3 M).

1) Méthode A

On dilue 68 µl d'une solution d'AH-dUTP à 6 µmole/ml (soit 0,4 µmole) à 250 µl d'hydrogénocarbonate de triéthylammonium (TEAB) 0,1 M pH 7,8 et on ajoute 320 µl d'une solution de cryptate de NHS (4 mg/ml dans l'acétonitrile) préparée comme suit. Le cryptate d'Europium [(bis-bpy)-(bpy-diester)] décrit dans l'exemple 4, section A, de la demande EP 0 321 353 est hydrolysé par NaOH et le cryptate diacide obtenu est purifié sur colonne RP-18 HPLC (gradient d'acétonitrile dans de l'acide trifluoroacétique à 1% dans l'eau). Le cryptate d'Europium [(bis-bpy)-(bpy-diacide)] ainsi obtenu (4mg) est dissout dans 0,5 ml d'acétonitrile anhydre et on ajoute 1mg de N-hydroxysuccinimide, puis une solution de 1,9 mg de dicyclohexylcarbodiimide dissout dans 0,5 ml d'acétonitrile. Après 16 h de réaction, le précipité de dicyclohexylurée est filtré et la solution de cryptate de N-hydroxysuccinimide est utilisée directement pour le couplage.

Après 45 min sous agitation, on ajoute 15 µl de TEAB 1M pH 8,5 puis on injecte le mélange sur une colonne Superdex peptide HR 10/30 (Pharmacia) en éluant par du TEAB 0,05M pH 7 contenant 10 % d'acétonitrile (débit 1 ml/min).

On collecte le composé de $R_t \cong 16,4$ mn, puis cette fraction dénommée fraction 1 est concentrée sous vide (speed-vac) jusqu'à un volume de 350 µl et contient 8 UA₃₀₄ nm. En estimant un $\epsilon_{304} \cong 35000$, on estime que la concentration en K-dUTP est d'environ 0,72 mM.

Une aliquote (90 µl) de cette fraction 1 est injectée sur la même colonne Superdex peptide éluee par un tampon triéthylammonium acétate 25 mM pH 7 contenant 5 % d'acétonitrile. La fraction correspondant au seul pic du chromatogramme est collectée (16 min < R_t < 19 min) et concentrée sous vide (speed-vac). On obtient 150 µl d'une solution de K-dUTP dénommée fraction 2 contenant 1,95 UA₃₀₄ nm.

Le composé est analysé en spectrométrie de masse (électrospray mode positif) :

$$(M-2H)^+ = 1431$$

$$(M-2H+CH_3COOH)^+ = 1491.$$

Le spectre UV dans l'eau présente un maximum à 241 nm caractéristique de la partie nucléosidique de la molécule ($\lambda_{max} = 289$ nm, $\epsilon = 10700$, $\lambda_{max} = 240$ nm $\epsilon = 7100$) et un maximum à 304 nm proche du λ_{max} de 305 nm ($\epsilon = 30000$) caractéristique du cryptate d'Europium. On observe un rapport $A_{304}/A_{241} \cong 0,83$ compatible avec la structure proposée.

2) Méthode B

On dissout 0,08 μmol d'une solution d'AH-dUTP dans 80 μl de tampon borate 0,1 M pH 8,6 et on ajoute 90 μl d'une solution de cryptate de NHS (4 mg/ml) préparée comme décrit ci-dessus dans la méthode A.

5 Après 60 min à 20°C, on ajoute 5 μl de TEAB 1M pH 8,5 et 45 μl d' H_2O .
On injecte la totalité du mélange réactionnel sur une colonne Superdex peptide HR 10/30 (Pharmacia) en éluant par du TEAB 0,05M pH 7 contenant 10 % d'acétonitrile (débit 1 ml/min).

10 On collecte le pic $R_t \cong 16,1$ mn qui présente un maximum à 304 nm et un rapport $A_{304}/A_{241} \cong 0,79$. On obtient environ 0,03 μmol de composé K-dUTP.

EXEMPLE 2 : Purification du conjugué (K-dUTP) par échange d'ion

On utilise une colonne C10/20 (Pharmacia Biotech., Uppsala, S) remplie de DEAE Sépharose® Fast Flow (Pharmacia) équilibrée dans un tampon TEAB
15 10 mM contenant 10 % de méthanol. On dépose une solution de K-dUTP contenant également du cryptate d'euporium trisbipyridine fonctionnalisé non conjugué et on élue la colonne (8 ml/mn) par 40 ml de tampon A (TEAB 10 mM contenant 10 % de méthanol). On collecte des fractions de 4 ml et on mesure la fluorescence des fractions éluées ($\lambda_{\text{excitation}} = 337$ nm, $\lambda_{\text{émission}} = 620$ nm). Le
20 cryptate non conjugué est élué dans les fractions 4 et 5, c'est-à-dire peu après le volume mort de la colonne.

On continue l'élution (8 ml/mn) par un gradient linéaire de 10 mM TEAB 10 % méthanol (100 ml) à 200 mM TEAB 10 % méthanol (100 ml) et on collecte des fractions de 5 ml. On observe que la fluorescence (620 nm) est concentrée
25 dans les tubes 43 à 44 ce qui indique que le K-dUTP est élué à une concentration $\cong 0,16$ mM TEAB. Les fractions contenant le K-dUTP sont réunies et concentrées.

EXEMPLE 3 : Incorporation du conjugué dUTP-cryptate d'euporium trisbipyridine (K-dUTP) au cours de la copie d'un ADN simple brin par une 30 polymérase (analyse par PAGE et autoradiographie)

L'ADN matrice est obtenu par amplification PCR (de l'anglais « Polymerase Chain Reaction ») d'un fragment du gène k-ras (exon I) limité par les amorces suivantes :

35 Amorce k-ras EX1 Sens S 5' d(GGC CTG CTG AAA ATG ACT GAA TAT) 3'
Solution stock à 3 $\text{UA}_{260}/\text{ml}$ soit environ $1,2 \cdot 10^{-5}\text{M}$

Amorce k-ras EX1 Antisens AS 5' d(TGT TGG ATC ATA TTC GTC CAC AAA ATG) 3'
Solution stock à 3 UA₂₆₀/ml soit environ 1,2. 10⁻⁵M.

L'amorce AS utilisée ici pour la PCR ci-dessous est biotinylée en son extrémité 5'. Un ADN double-brin biotinylé est synthétisé par PCR en suivant le protocole suivant:

- 5
- Milieu PCR 25 µl BUAM (CIS bio international) 10X
 - 8 µl amorce Antisens-bio
 - 8 µl amorce Sens
 - 10 µl taq polymérase (1,25U/ml)
 - 10 µl dNTP (quatre dNTP naturels 5mM chaque)
 - 100 µl ADN placenta humain (Sigma) 0,01 µg/µl
 - 89 µl eau milli-Q.
- 10

Le milieu PCR est réparti en 5 microtubes (5 x 50 µl), les tubes sont placés dans un thermocycleur et soumis à 31 cycles de PCR suivant le protocole de l'exemple 5.

15

L'ADN double brin issu de la PCR (équivalent à 25 pmoles d'amorce biotine) est incubé en présence de 300 µg de Dynabeads-streptavidine M-280 (DynaI, N).

Après lavage, l'ADN simple brin (SS ADN) est élué par de la soude 0,1 N puis le surnageant est décanté et neutralisé (HCl dilué), puis concentré jusqu'à un volume résiduel de 60 µl.

20

Pour la suite de la manipulation, on utilise une amorce AS (non biotinylée) telle que définie ci-dessus marquée au ³²P décrit dans J. Sambrook et al. Molecular cloning a laboratory manuel, 1989.

25 On prépare des milieux pour la réaction de copie en utilisant :

- K-dUTP fraction 1 (Rt = 16,4 min) obtenue dans l'exemple 1, diluée à 0,25 mM
 - dTTP 0,25 mM
 - Mélange de 3 désoxynucléotides triphosphates (dATP, dCTP et dGTP) 0,625 mM chacun
 - Taq ADN polymérase 1,25 U/µl
 - Tampon Taq (BUAM) 10X (Cis bio international)
 - Amorce AS (3 UA₂₆₀/ ml) et amorce AS marquée au ³²P (0,06 UA₂₆₀/ml).
- 30

Parallèlement, on fait une réaction témoin dans laquelle le K-dUTP est remplacé par 0,6 µl de dTTP (0,25 mM) de façon à ce que la concentration en dTTP dans le milieu soit la même que pour les trois autres triphosphates.

35

	Volume (μl)
BUAM 10 X	1
Taq DNA polymérase	0,2
Amorce S ³² P	2
Amorce S	0,35
3 Triphosphate	0,5
K-dUTP	0,6
dTTP	0,6
SS ADN	5

On vérifie par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (PAGE) que la réaction en présence de conjugué dUTP produit une bande correspondant à une copie de l'ADN sur toute sa longueur et présentant une mobilité proche de la bande obtenue pour la réaction témoin ou seuls les quatre nucléotides naturels sont introduits. D'autre part, dans les deux cas, le profil d'électrophorèse ne montre pas d'arrêts de lecture.

La même manipulation a été effectuée en utilisant des rapports dTTP/K-dUTP variables, entre autre en utilisant 0,3 μl de K-dUTP et 0,9 μl de dTTP (dTTP/K-dUTP = 3).

La réaction de copie a également été effectuée en présence de DNA polymérase I, fragment de klenow (37°C, 45 mn) et donne sensiblement les mêmes résultats.

Ces résultats montrent que le conjugué dUTP-cryptate d'euporium trisbipyridine est bien incorporé par une polymérase (taq polymérase ou fragment de Klenow) au cours de la copie de l'ADN simple brin.

EXEMPLE 4 : Incorporation du conjugué dUTP-cryptate d'euporium trisbipyridine (K-dUTP) au cours de la copie d'un ADN simple brin par une polymérase (mise en évidence par transfert d'énergie non radiatif en temps résolu)

On utilise l'ADN simple brin décrit dans l'exemple 3.

On prépare un microtube dans lequel se déroule la réaction de copie (50 μl).

- K-dUTP : 0,25 mM fraction 1 (Rt = 16,4 min) obtenu dans l'exemple 1
- dTTP : 0,25 mM
- Mélange de 3 désoxynucléotides triphosphates : dATP, dCTP, dGTP

0,625 mM chacun

- 5
- Amorce AS biotinylée (voir exemple 3) : 3 UA₂₆₀/ml
 - Taq DNA polymérase : 1,25 U/μl
 - Tampon Taq : BUAM 10X

10

15

	Volume (μl)
BUAM 10 X	5
Taq polymérase	1
Amorce biotinylée	1,75
Mix 3 dNTP	2,5
K-dUTP	3
dTTP	3
SS ADN	30
eau milli-Q	3,75

20 Les tubes sont portés 2 min à 90°C (dénaturation) puis incubés à 70°C dans un thermocycleur. Des prélèvements (9 μl) sont effectués à 0, 5, 10, 15 et 20 min. Les aliquotes sont placées dans des tubes contenant 2 μl de solution EDTA 0,5 M pH 8.

25 On obtient l'équivalent de 12,5 pmoles d'amorces (donc 12,5 pmoles de biotine) par 50 μl de réaction, soit 2,5 pmoles pour 10 μl. D'autre part, on a 150 pmoles de K-dUTP pour 10 μl.

Les prélèvements sont dilués à raison de 8 μl dans 200 μl de tampon A (phosphate 0,1 M pH 7, NaCl 0,15 M, KF 0,4 M et 0,1 % BSA) puis dilués au 1/10 dans le même tampon.

30 On pipette 20 μl (équivalent à $2 \cdot 10^{-14}$ mole de biotine) de prélèvements (dilués comme décrit ci-dessus) dans les puits « Essais » d'une microplaque (96-wells flat bottom black low fluorescence microplaque HTRF-96 PACKARD). On ajoute 30 μl de conjugué SA-XL₆₆₅ (conjugué de streptavidine et d'allophycocyanine chimiquement modifiée, CIS bio international) dilué dans le tampon A (concentration finale $2 \cdot 10^{-8}$ M) dans chaque puits « essais » ($6,5 \cdot 10^{-13}$ mole de SA soit 30 équivalent par rapport à la biotine), puis 250 μl de tampon A.

35

On pipette 20 µl de prélèvement dilués dans les puits « Blancs » auxquels on ajoute 280 µl de tampon A.

Après incubation (15 mn à 37°C) on lit immédiatement la fluorescence à 620 nm et à 665 nm sur un appareil Discovery (Microplate HTRF - analyser PACKARD).

- 5 On calcule les rapports des intensités de fluorescence $Re = E665/E620$ pour chaque essai et $Ro = B665/B620$ pour chaque blanc, puis on calcule la valeur $DF/F = (Re-Ro)/Ro$ exprimée en pourcentage, les résultats sont reportés dans le tableau 1 ci-dessous.

Tableau 1

10

temps (min)	E665	E620	Re = E665/E620	B665	B620	Ro = B665/B620	DF/F
0	1 590	35 770	0,044	1 615	39 423	0,041	8 %
5	3 670	42 016	0,087	1 718	42 961	0,040	118 %
10	4 077	40 448	0,100	1 713	42 234	0,040	149 %
15	4 185	38 670	0,108	1 633	40 089	0,040	166 %
20	5 357	49 403	0,108	1 993	51 777	0,038	182 %

En portant la valeur DF/F en fonction du temps de réaction, on obtient le profil typique d'une cinétique d'incorporation de nucléotide au cours d'une copie enzymatique (Figure 1).

15

EXEMPLE 5 : Incorporation du conjugué dUTP-cryptate d'euporium trisbipyridine (K-dUTP) au cours d'une réaction de PCR et mesure de fluorescence en temps résolu par transfert d'énergie non radiatif sur l'accepteur XL665

20

1/ PCR :

On amplifie une région de l'exon 1 du gène k-ras limité par les amorces S et AS décrites dans l'exemple 3.

On génère ainsi un produit d'amplification d'une longueur de 117 bp et de séquence (brin sens)

25

5' d(GGC CTG CTG AAA ¹ATG ACT GAA TAT AAA CTT GTG GTA GTT
¹⁰GGA GCT GGT GGC GTA GGC AAG AGT GCC TTG ²⁰ACG ATA CAG CTA ATT
CAG AAT CAT TTT GTG ³⁰GAC GAA TAT GAT CCA ACA)₃'

On choisit une sonde (56 % G + C) dans la partie centrale de la séquence amplifiée (soulignée ci-dessus) une biotine est introduite en son extrémité 5' à l'aide d'un bras N-4-aminohexyl-dC (A. Roget et al., Nucleic Acids Res., 1989, 17, 7643-7651) : Sonde CP : biotine-Dc GCC TTG ACG ATA CAG C

5 Solution stock à 0,3 UA₂₆₀/ml soit environ $1,7 \cdot 10^{-6}$ M

On utilise 48 µl de la fraction K-dUTP (13 UA₃₀₄/ml) repurifiée dans un tampon TEAAc (voir exemple 1, méthode A) que l'on dilue par 32 µl d'eau milli-Q soit une concentration finale de K-dUTP d'environ 0,2 mM.

10 On utilise un mélange des 4 désoxynucléotides triphosphates naturels respectivement : dATP 5 mM, dCTP 5 mM, dGTP 5 mM et dTTP 3,5 mM.

On prépare le mélange stock PCR suivant :

- 25 µl Tampon BUAM (CIS bio international) 10X
- 10 µl dNTP
- 8 µl d'amorce S
- 15 - 8 µl d'amorce AS
- 10 µl de taq ADN polymérase (soit 12,5 U)
- 9 µl eau milli-Q.

Dans des microtubes pour PCR, on prépare les milieux PCR selon le tableau suivant, l'ADN utilisé est de l'ADN de placenta humain (Sigma) à 0,01 µg/µl.

20

	T-	T+	k1-	k1+	k2-	k2+
mélange (µl)	7	7	7	7	7	7
dTTP (µl)	1,5	1,5	0	0	0	0
K-dUTP (µl)	0	0	1	1	2	2
DNA (µl)	0	10	0	10	0	10
Eau milli-Q (µl)	16,5	6,5	17	7	16	6
[K-dUTP] (µM)	0	0	8	8	16	16
[dTTP] (µM)	200	200	140	140	140	140
[K-dUTP]/[dTTP]	-	-	0,06	0,06	0,12	0,12

On effectue la réaction PCR en utilisant le protocole suivant :

- 1. 5 mn / 95°C
- 2.1 1 mn / 94°C (dénaturation)
- 2.2 1 mn / 60°C (circularisation)
- 25 2.3 1 mn / 70°C (élongation)
- (31 cycles)
- 3.1 8 mn / 70°C (élongation finale)

On contrôle les réactions par électrophorèse sur gel d'agarose. Seuls des tubes contenant de l'ADN (T+, K1+ et K2+) présentent une bande de longueur attendue (par comparaison avec la bande 124 bp du marqueur VIII Boehringer).

2) Mesure de transfert d'énergie en temps résolu :

- 5 Le principe de la mesure consiste à hybrider la sonde CP biotinylée sur le fragment d'ADN amplifié, puis de mettre l'hybride en présence d'un conjugué streptavidine-XL665 (allophycocyanine réticulée). L'incorporation de bases marquées au cryptate d'euporium (donneur) se traduit par un transfert d'énergie non radiatif sur XL665 (accepteur) lorsque le donneur est excité vers 337 nm.
- 10 Dans ce cas, l'accepteur émet de la fluorescence à 665 nm avec une durée de vie longue, ce qui permet de différencier ce signal de la fluorescence propre de l'accepteur qui présente une durée de vie courte.

- On mesure en temps résolu à la fluorescence à 620 nm et à 665 nm en présence de l'accepteur ("essai" E620 et E665) et en l'absence de l'accepteur ("blanc" B620 et B665), puis on calcule le rapport $Re = E665 / E620$ et $Ro = B665 / B620$. Ensuite on calcule la valeur $DF/F = (Re - Ro) / Ro$ exprimée en pourcentage une augmentation de valeur DF / F montre la présence d'un transfert d'énergie et donc l'incorporation du cryptate dans l'ADN amplifié.

- On utilise les milieux K1-, K1+, K2- et K2+ provenant des réactions PCR.
- 20 Dans des microtubes, on dépose 2 µl de chaque milieu PCR auxquels on ajoute 10 µl de sonde CP (0,03 UA260 / ml) et 13 µl de tampon BUAM (2X), on porte les tubes scellés 10 mn à 94°C puis 20 mn à 50°C à l'aide d'un thermocycleur. On dilue 5 µl de milieu d'hybridation dans 200 µl de tampon A et on pipette 40 µl de cette dilution dans les puits "Essais" d'une plaque de microtitration et 40 µl dans les
- 25 puits "blanc" (96 well flat bottom microplate HTRF, Packard).

On ajoute 40 µl de SA-XL665 à 3.10^{-8} M (CIS bio international) aux puits "Essais" et 200 µl de tampon A. On ajoute 240 µl de tampon A aux puits "Blanc".

On incube 15 mn à 37°C et on effectue immédiatement la mesure de fluorescence sur un appareil Discovery (Packard).

- 30 Les résultats sont rapportés dans le tableau 2 ci-après.

Tableau 2

tube	E665	E620	Re	B665	B620	Ro	DF/F
K1-	889	16053	0,0554	847	16825	0,0503	10%
K1+	2406	28392	0,0847	1366	32494	0,0420	102%
K2-	1320	29015	0,0455	1273	31452	0,0405	12%
K2+	3304	36615	0,0902	1491	36278	0,0411	120%

Les résultats montrent que le cryptate d'euporium (K-dUTP) est incorporé au cours d'une réaction de PCR. De plus, la présence des molécules de cryptate liées à l'ADN amplifié peut être mise en évidence par l'hybridation d'une sonde spécifique de cet ADN amplifié et révélée par un transfert d'énergie non radiatif
5 entre le cryptate et un accepteur lié à la sonde hybridée.

EXEMPLE 6 : Mesures comparées des durées de vie du conjugué dUTP -cryptate d'euporium trisbipyridine (K-dUTP) et du cryptate seul

10 On utilise comme cryptate de référence le cryptate d'Euporium [(bis-bpy)(bpy-di(amidoéthylèneamine)) décrit dans l'exemple 4 de la demande EP 0 321 353 (ci-après dénommé KNH₂).

On prépare une solution mère de KNH₂ dans l'eau et on détermine sa concentration par mesure de la densité optique à 306 nm en prenant un
15 $\epsilon_{306} \cong 30000$. La solution mère ($6,7 \times 10^{-4}$ M) est diluée au 1/100^{ème} dans du tampon Tris-HCl 0,1M pH 9; 100 µl de cette dilution intermédiaire sont ensuite dilués dans 600 µl du même tampon. Parallèlement, une solution mère de K-dUTP (préparé selon l'exemple 1, méthode A) dans l'eau , dont la concentration est estimée à 3×10^{-5} M par mesure de la densité optique à 304 nm ($\epsilon_{304} \cong 35000$).
20 Cette solution est diluée à 50µl dans 1 ml de tampon Tris-HCl 0,1M pH 9.

On mesure les valeurs de la durée de vie d'émission de l'Euporium (τ en ms) en utilisant un spectrofluorimètre en temps résolu de type LS50 (Perkin-Elmer) et des cuves Helma 5 mm x 5 mm.

On observe que la durée de vie est de 0,39 ms pour KNH₂ et de 0, 61ms
25 pour K-dUTP.

De façon analogue, on effectue des dilutions dans du tampon Tris-HCl 0,1M pH 7,4; dans ces conditions, la durée de vie est de 0,36 ms pour KNH₂ et de 0, 65 ms pour K-dUTP.

Ces résultats montrent que le couplage du nucléotide sur la molécule de
30 cryptate entraîne une augmentation de la durée de vie de l'Euporium et de nouvelles caractéristiques de fluorescence pour le conjugué cryptate- nucléotide par rapport au cryptate de référence.

REVENDECATIONS

1. Conjugué fluorescent de nucléoside ou de nucléotide, caractérisé en ce qu'il comprend :

- 5 - un ribo- ou désoxyribo-nucléoside ou nucléotide natif ou chimiquement modifié ou conjugué à une ou plusieurs molécules marqueur(s), dont au moins un atome de carbone du cycle ou d'azote exocyclique du cycle purique ou pyrimidique est susceptible d'être impliqué dans une liaison avec un marqueur fluorescent, et
- 10 - au moins un marqueur fluorescent lié au(x)dit(s) atome(s) constitué par un cryptate de terre rare.

2. Conjugué selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il s'agit d'un conjugué fluorescent de nucléotide dans lequel le ribo- ou désoxyribo-nucléotide est choisi parmi AMP, ADP, ATP, GMP, GDP, GTP, CMP, CDP, CTP, UMP, UDP, UTP, TMP, TDP, TTP, 2Me AMP, 2Me ADP, 2Me ATP, 1Me GMP, 1Me GDP, 1Me

15 GTP, 5Me CMP, 5Me CDP, 5Me CTP, 5MeO CMP, 5MeO CDP, 5MeO CTP, 7-déaza-ATP, 7-déaza-GTP et les désoxy- ou didésoxy-ribonucléotides correspondants.

3. Conjugué selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que le ribo- ou désoxyribo-nucléotide est choisi parmi :

- 20 - les dérivés de la 2'-désoxy-uridine-5'-triphosphate ou de l'uridine-5'-triphosphate fonctionnalisés en position 5 de la base,
- les dérivés de la 2'-désoxy-cytidine-5'-triphosphate ou de la cytidine-5'-triphosphate fonctionnalisés en position 4 ou 5 de la base,
- les dérivés de la 2'-désoxy-adénosine-5'-triphosphate ou de l'adénosine-
- 25 5'-triphosphate fonctionnalisés en position 6 ou 8 de la base,
- les dérivés de la 2'-désoxy-guanosine-5'-triphosphate ou de la guanosine-5'-triphosphate fonctionnalisés en position 6 ou 8 de la base,
- les dérivés de la 2'-désoxy-7-déaza-adénosine-5'-triphosphate ou de la 7-déaza-adénosine-5'-triphosphate fonctionnalisés en position 7 de la base, et
- 30 - les dérivés de la 2'-désoxy-7-déaza-guanosine-5'-triphosphate ou de la 7-déaza-guanosine-5'-triphosphate fonctionnalisés en position 7 de la base.

4. Conjugué selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il s'agit d'un conjugué fluorescent de nucléoside dans lequel le ribo- ou désoxyribo-nucléoside est choisi parmi A, G, C, U, T, les désoxy- ou didésoxynucléosides correspondants,

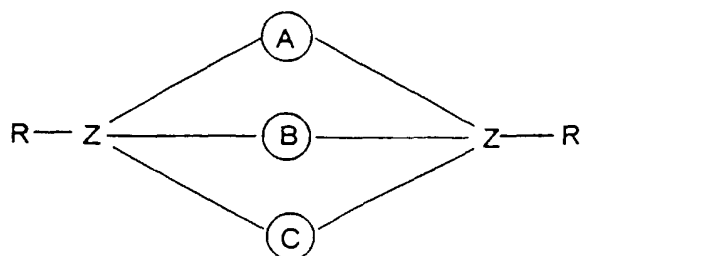
35 et leurs analogues chimiquement modifiés.

5. Conjugué selon la revendication 4, caractérisé en ce que le désoxyribonucléoside est choisi parmi la 3'-azido-3'-désoxythymidine et ses dérivés ; et les analogues 2', 3'-dédésoxy de A, T, C, G, U, I.

6. Conjugué selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que le marqueur fluorescent est lié soit directement, soit par l'intermédiaire d'un bras espaceur.

7. Conjugué selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que le marqueur fluorescent est un cryptate de terbium, d'euprium, de samarium ou de dysprosium.

8. Conjugué selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisé en ce que le marqueur fluorescent est un cryptate de terre rare constitué d'au moins un sel de terre rare complexé par un composé macropolycyclique de formule



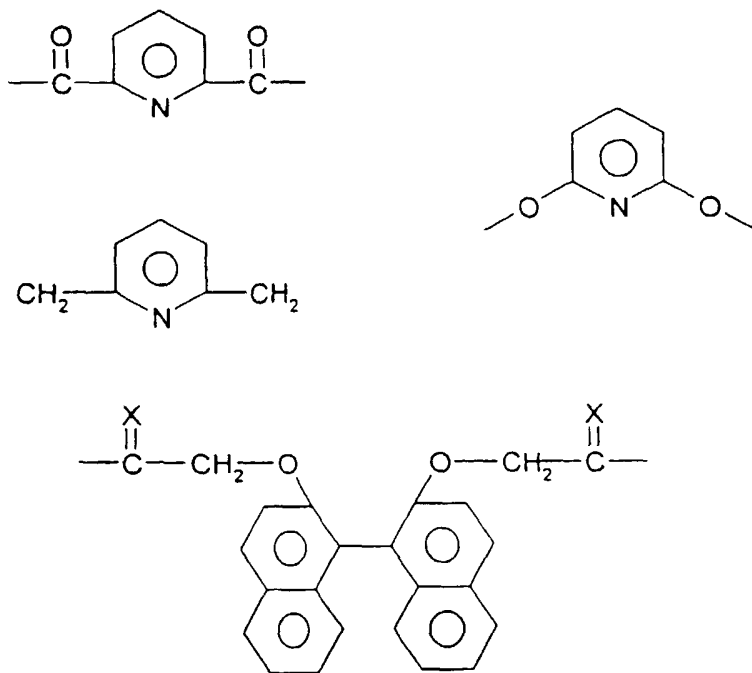
15 dans laquelle Z est un atome ayant 3 ou 4 valences, R est rien ou représente l'hydrogène, le groupe hydroxy, un groupe amino ou un radical hydrocarboné, les radicaux bivalents (A), (B) et (C), sont indépendamment l'un de l'autre des chaînes hydrocarbonées qui contiennent éventuellement un ou plusieurs hétéroatomes et sont éventuellement interrompues par un hétéromacrocycle, au moins l'un des radicaux (A), (B) et (C) comportant de plus
20 au moins un motif moléculaire ou étant essentiellement constitué par un motif moléculaire, ledit motif moléculaire possédant une énergie de triplet supérieure à celle du niveau émissif de l'ion de terre rare complexé.

9. Conjugué selon la revendication 8, caractérisé en ce que le marqueur fluorescent est un cryptate de terre rare de formule (I) dans laquelle le motif moléculaire est choisi parmi la phénanthroline, l'anthracène, le benzène, le naphthalène, les bi- et ter-phényle, l'azobenzène, l'azopyridine, la pyridine, les bipyridines, les bisquinoléines et les composés de formules ci-après :



30 $- \text{C}_2\text{H}_4 - \text{X}_1 - \text{CH}_2 - \text{C}_6\text{H}_4 - \text{CH}_2 - \text{X}_2 - \text{C}_2\text{H}_4 -$

X_1 et X_2 pouvant être identiques ou différents désignent l'oxygène, l'azote ou le soufre,



X étant l'oxygène ou l'hydrogène.

- 5 10. Conjugué selon la revendication 8 ou 9, caractérisé en ce que le marqueur fluorescent est un cryptate de terre rare constitué de l'ion terbium ou europium complexé par l'un des composés macrocycliques ci-après :

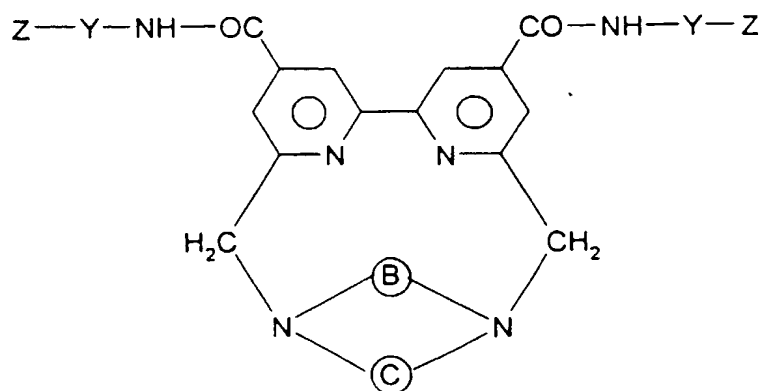
(22)phénanthroline ; (22)phénanthroline amide ; (22)anthracène ;
 (22)anthracène amide ; (22)bi-isoquinoléine ; (22)biphényl-bis-pyridine ;
 10 (22)bipyridine ; (22)bi-pyridine amide ; les macropolycycles tris-bipyridine, tris-phénanthroline, phénanthroline-bis-bipyridine, bi-isoquinoléine-bis-bipyridine, bis-bipyridine diphenylbipyridine.

11. Conjugué selon la revendication 10, caractérisé en ce que le marqueur fluorescent est le cryptate d'euporium Eu trisbipyridine.

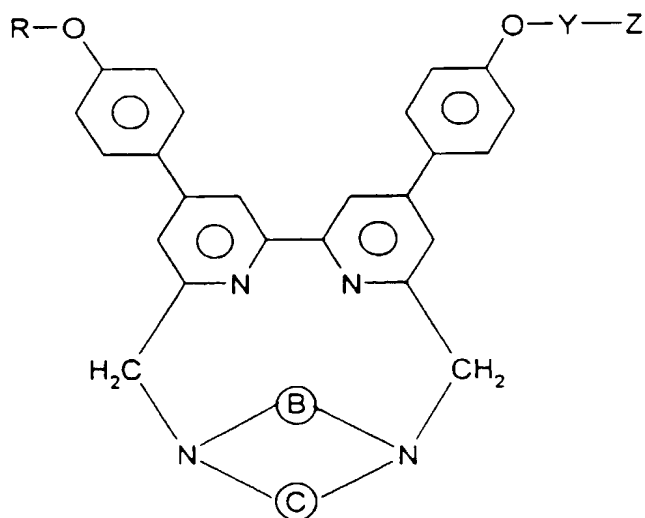
- 15 12. Conjugué selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisé en ce que le marqueur fluorescent est un cryptate de terre rare constitué d'au moins un sel de terre rare complexé par un composé macropolycyclique comprenant un motif moléculaire choisi parmi les bipyrazines, les bipyrimidines et les hétérocycles azotés comportant des groupements N-oxydes.

- 20 13. Conjugué selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisé en ce que le marqueur fluorescent est un cryptate de terre rare constitué d'au moins

un sel de terre rare complexé par un composé macropolycyclique répondant à l'une des formules II ou III ci-après :

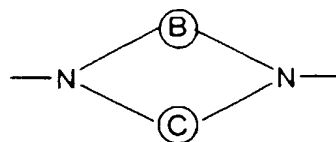


II



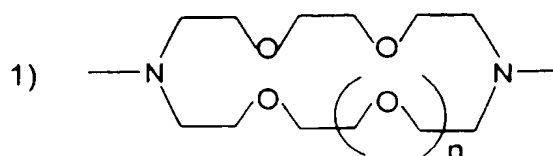
III

- 5 dans lesquels :
- le cycle de formule



est l'un des cycles suivants :

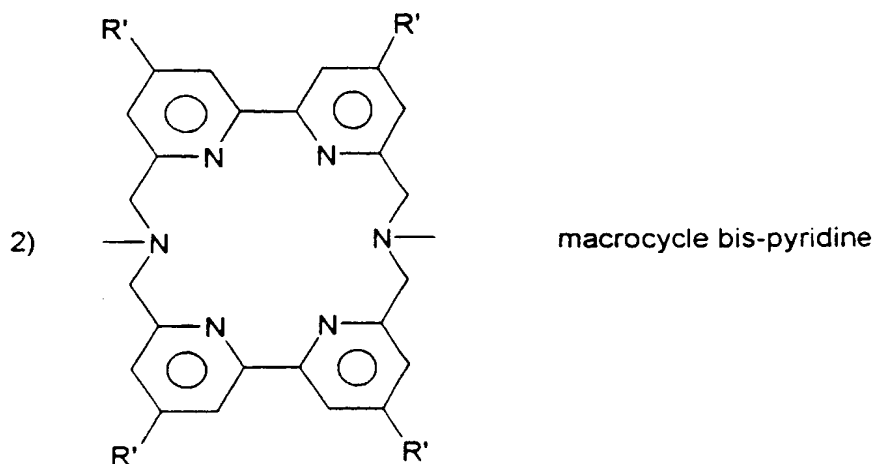
10



$n = 0$ ou 1

macrocyclé $[N_2O_4]$ ou cycle (22)

macrocyclé $[N_2O_3]$ ou cycle (21)



- Y est un groupe ou un bras d'espacement qui est constitué par un radical
 5 organique bivalent, choisi parmi les groupes alkylène linéaires ou ramifiés en C₁ à C₂₀ contenant éventuellement une ou plusieurs doubles liaisons et/ou étant éventuellement interrompus par un ou plusieurs hétéroatomes tels que l'oxygène, l'azote, le soufre ou le phosphore, parmi les groupes cycloalkylène en C₅ à C₈ ou parmi les groupes arylène en C₆ à C₁₄, lesdits groupes alkylène, cycloalkylène ou
 10 arylène étant éventuellement substitués par des groupes alkyle, aryle ou sulfonate ;

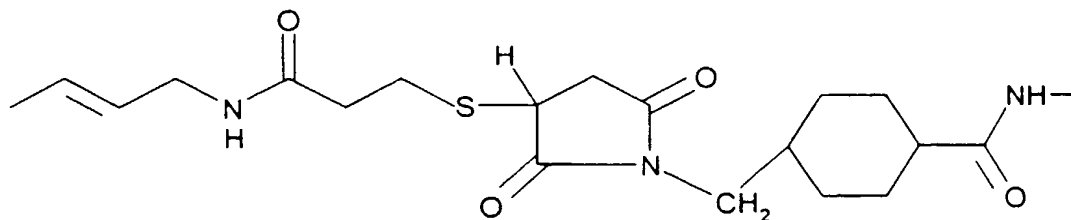
- Z est un groupe fonctionnel susceptible de se lier de façon covalente avec une substance biologique ;

- R est un groupe méthyle ou représente le groupe -Y-Z ;

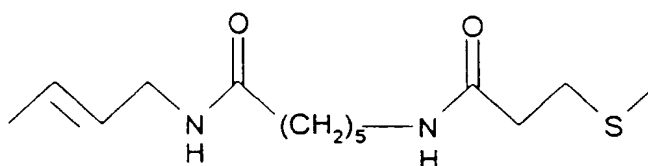
15 - R' est l'hydrogène ou un groupe -COOR'' dans lequel R'' est un groupe alkyle en C₁ à C₁₀ et représente de préférence le groupe méthyle, éthyle ou tertibutyle ou bien R' est un groupe -CO-NH-Y-Z.

14. Conjugué selon l'une quelconque des revendications 1 à 13, caractérisé en ce que le marqueur fluorescent est lié au ribo- ou au désoxyribo-
 20 nucléoside ou nucléotide par l'intermédiaire d'un bras d'espacement constitué par un radical organique bivalent, choisi parmi les groupes alkylène linéaires ou ramifiés en C₁-C₂₀, contenant éventuellement une ou plusieurs doubles liaisons ou triples liaisons et/ou éventuellement interrompus par un ou plusieurs hétéroatomes, tels que l'oxygène, l'azote, le soufre ou le phosphore ; groupes carbamoyle et
 25 carboxamido ; les groupes cycloalkylène en C₅-C₈ et les groupes arylène en C₆-C₁₄, lesdits groupes alkylène, cycloalkylène ou arylène étant éventuellement substitués par des groupes alkyle, aryle ou sulfonate.

15. Conjugué selon la revendication 14, caractérisé en ce que le bras d'espacement est choisi parmi les groupes :



5 et



16. Conjugué selon l'une des revendications 1 à 14, caractérisé en ce que le
10 désoxyribonucléotide est la désoxyuridine, le marqueur fluorescent est le cryptate d'euporium Eu trisbipyridine et le bras d'espacement est un groupe 3-aminoallyle.

17. Procédé de préparation des conjugués selon l'une quelconque des
revendications 1 à 16, caractérisé en ce qu'on fait réagir un ribo- ou désoxyribo-
nucléoside ou nucléotide natif ou chimiquement modifié ou conjugué à une ou
15 plusieurs molécules marqueur(s), dont au moins un atome de carbone du cycle ou
d'azote exocyclique du cycle purique ou pyrimidique est susceptible d'être impliqué
dans une liaison avec un marqueur fluorescent avec au moins un marqueur
fluorescent lié au(x)dit(s) atome(s) constitué par un cryptate de terre rare.

18. Utilisation d'un conjugué selon l'une quelconque des revendications 1
20 à 16 à titre de marqueurs.

19. Utilisation d'un conjugué selon l'une quelconque des revendications 1
à 3 et 6 à 16 en tant que nucléotide constitutif dans une réaction de synthèse
d'acide nucléique.

20. Utilisation d'un conjugué selon l'une quelconque des revendications 1
25 à 3 et 6 à 16 pour la détection et/ou la localisation de composés contenant au
moins une séquence d'acide nucléique.

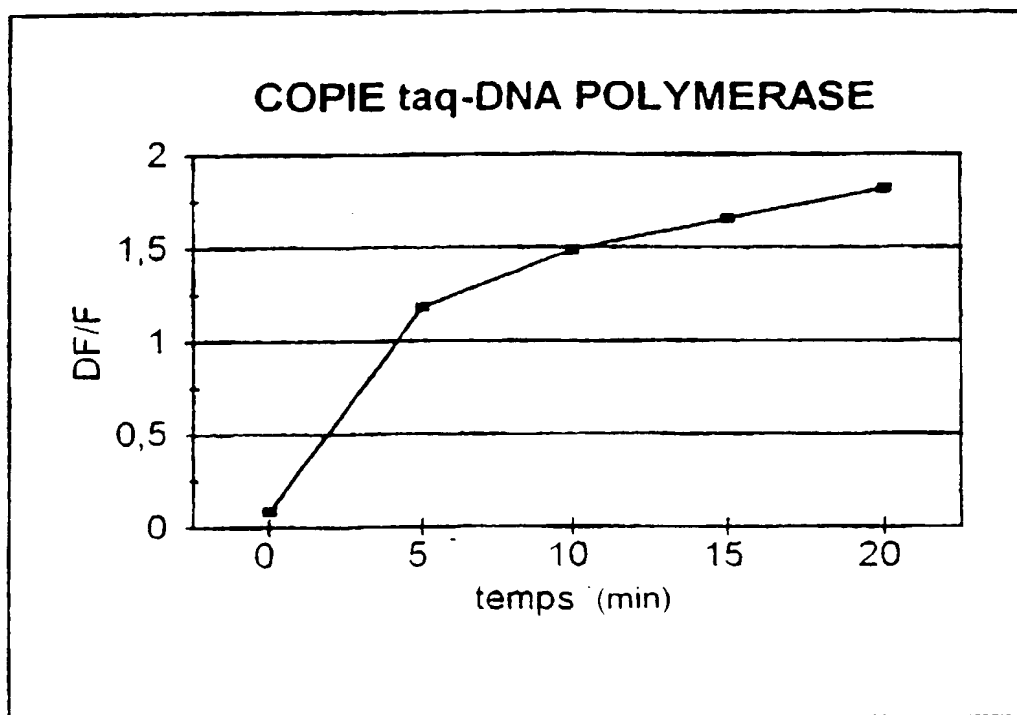
21. Utilisation selon la revendication 19 dans un procédé de mesure de
l'activité enzymatique d'une enzyme impliquée dans une réaction de synthèse
d'acide nucléique, caractérisée en ce que l'on mesure la fluorescence émise

directement ou indirectement par ledit conjugué, ladite émission de fluorescence étant corrélée au taux d'incorporation dudit conjugué dans le polynucléotide d'acide nucléique synthétisé.

22. Utilisation selon la revendication 21, caractérisée en ce que l'activité
5 enzymatique est une activité polymérase, transcriptase inverse, transférase ou ligase.

23. Utilisation selon la revendication 19 dans un procédé de mesure de l'activité enzymatique ayant pour substrat un acide nucléique.

FIGURE 1



DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
Y	EP 0 321 353 A (ORIS SA) 21 juin 1989 * le document en entier *	1-23
Y	WO 92 13264 A (CIS BIO INT) 6 août 1992 * exemple 1 *	1-23
Y	EP 0 180 492 A (COMMISSARIAT ENERGIE ATOMIQUE) 7 mai 1986 * revendications 13,14 *	1-23
Y	WO 92 01225 A (CIS BIO INT) 23 janvier 1992 * revendications 1-15 *	1-23
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.CL.6)
		C07H C12Q
Date d'achèvement de la recherche		Examineur
28 mai 1998		Scott, J
<p>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cite pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant</p>		

1

EPO FORM 1503 03.92 (P04C13)